



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Zoran Novak, Mateja Primožič, Katja Vasić, Maja Leitgeb

***PROCESNE SUROVINE ZA BIO IN
PREHRAMBENO INDUSTRIJO***

Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo)

Maribor, 2015

Copyright 2015 1. izdaja

Avtorji: Zoran Novak, Mateja Primožič, Katja Vasić, Maja Leitgeb

Vrsta
publikacije: zbrano gradivo

Založnik: FKKT Univerze v Mariboru

Naklada: On-line

Dostopno na
naslovu: na univerzitem učnem okolju Moodle pri predmetu
Procesne surovine za bio in prehrambeno industrijo in na
internetni strani FKKT, UM – e - gradiva
(<http://www.fkkt.um.si/egradiva/egradiva.php>)

Gradiva iz publikacije, brez dovoljenja avtorjev, ni dovoljeno kopirati, reproducirati, objavljati ali prevajati v druge jezike.

Vsebina

Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju.....	4
1. MLEKO IN NJEGOVA SESTAVA.....	5
1.1 Kemijska sestava kravjega mleka.....	5
1.2 Mikrobiologija surovega mleka.....	6
1.2.1 Vrste mikroorganizmov v mleku.....	7
1.2.2 Skupine mikroorganizmov, ki so prisotne v surovem mleku.....	7
1.3 Skupno število mikroorganizmov (SSMO).....	7
1.4 Ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij.....	8
1.4.1 Indirektne ali gojitvene metode.....	8
1.4.2 Direktne ali števne metode.....	10
1.4.3 Fizikalne in kemijske metode.....	10
1.5 Gojišča.....	11
VAJA 1: Ugotavljanje števila bakterij v svežem, pasteriziranem in UHT mleku.....	13
2. KAZEIN.....	15
VAJA 2: Izolacija proteinov iz biološkega materiala – izolacija kazeina iz mleka.....	17
3. ALKOHOLNA FERMENTACIJA.....	20
3.1 Metode za določevanje števila mikrobnih celic in koncentracije suhe mase...	21
3.1.1 Direktne ali števne metode.....	21
3.1.2 Določanje koncentracije suhe biomase.....	22
VAJA 3: Alkoholna fermentacija ob prisotnosti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	23
4. LITERATURA.....	25

Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju

1. V laboratorij vstopamo v zaščitnih haljah. Pri delu uporabljamo zaščitne rokavice.
2. **V laboratoriju ne jemo in ne pijemo!** Zaradi nevarnosti okužbe skozi usta, nos, oči in kožo, pri delu ne dajemo ničesar v usta (svinčnik, peresa, steklovina itd.).
3. Z živimi mikrobi delamo previdno in **aseptično** ob plamenu plinskega gorilnika.
4. Pri delu z gorilnikom pazimo, da nam plamen ne ožge kože, las ali halje.
5. Med delom z mikrobi in kužnino so vrata in okna zaprta, da zračni tok ne nosi mikrobov po laboratoriju.
6. Pri delu pazimo, da mikrobni kultur ne polivamo po mizi, po tleh in obleki. Z rokami se ne dotikamo kolonij in suspenzij živih mikrobov. **Če pride kužnina v stik s kožo ali delovno površino, obvestimo asistenta ali tehničnega sodelavca.** Kontaminirano delovno površino pokrijemo s staničevino in jo prelijemo z razkužilom. Razkužilo pustimo delovati najmanj 20 minut. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.
7. Kontaminiran material odlagamo v odlagalnike ali na označeno mesto in ga nato avtoklaviramo.
8. Kovinske predmete, ki pridejo v stik s kužnino (pincete, bakteriološke zanke itd.) sproti ožigamo v plamenu. Ožigamo tudi vratove epruvet, erlenmajeric in steklenic z mikrobi, preden jih odpremo in po uporabi.
9. Po opravljenem delu pospravimo za seboj in razkužimo delovne površine. Prepričamo se, da so dovodi plina do gorilnikov zaprti.
10. Pred in po začetku izvajanja vaj si skrbno umijemo roke z milom. Če je potrebno, roke tudi razkužimo.

1. MLEKO IN NJEGOVA SESTAVA

Mleko predstavlja živilo, ki s svojo edinstveno sestavo (visoka biološka vrednost beljakovin, maščob in laktoze) ter prisotnimi vitamini, mineralnimi snovmi, encimi, zaščitnimi snovmi in nekaterimi drugimi biogenimi faktorji vsebuje skoraj vse sestavine, potrebne za rast in razvoj organizma. Mleko je torej popolna naravna hrana. Definiramo ga kot biološko tekočino, ki je proizvod mlečne žleze in je prva hrana novorojenega sesalca ter mu omogoča uspešen razvoj v prvem, najbolj občutljivem življenjskem obdobju.

Prav tako je mleko zaradi svoje bogate sestave tudi izvrsten rastni medij za različne mikroorganizme, zato je dobro poznavanje mikroflore, ki lahko prispe v mleko, izjemnega pomena. Do okužb mleka z mikroorganizmi, ki jih praktično ne moremo preprečiti, lahko pride zaradi obolele krave molznice, slabo vzdrževane in neočiščene opreme za molžo, okužene krme, slabe higijene ljudi pri molži, nepravilnega skladiščenja surovega mleka itd. Število in vrsta mikroorganizmov v mleku sta odvisna predvsem od higienskih razmer v hlevu in od higijene pri molzi.

Za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov se poleg klasične, standardne metode ugotavljanja števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov na gojiščih, vse pogosteje uporabljajo tudi hitre metode. To so lahko instrumentalne metode pretočne citometrije (Bactoscan) ali pa metode z uporabo že pripravljenih gojišč na lističih (Petrifilm, Rida®coultt).

1.1 Kemijska sestava kravjega mleka

Kravje mleko sestavlja približno 87 % vode in 13 % suhe snovi (Tabela 1). Suho snov predstavljajo vse sestavine mleka razen vode in plinov in so porazdeljene v treh oblikah:

1. emulzija: voda in maščoba
2. koloidna raztopina: voda in beljakovine
3. prava raztopina: voda in laktoza, minerali

Tabela 1: Najpomembnejše sestavine v mleku

Sestavina	%
Maščoba	5,8
Beljakovine	2,6 - 4,2
Laktoza	4,6 - 4,9
Minerali	0,6 - 0,8
Skupaj suha snov	11 - 14
Voda	86 - 89

1.2 Mikrobiologija surovega mleka

Zaradi različnih podnebnih, higienskih in tehnoloških pogojev poteka proizvodnja mleka od proizvajalca do proizvajalca različno, zato se začetno število mikroorganizmov in sestava mikrobne populacije surovega mleka precej razlikujejo.

Ločimo primarno in sekundarno mikrofloro mleka. Število in vrsta mikroorganizmov, ki so prisotni v mleku neposredno po molži, predstavljajo začetno ali primarno mikrofloro mleka. Mikrofloro, ki je prisotna v mleku po prevzemu mleka s kmetije, torej po prečrpavanju mleka skozi molzni sistem v bazen in skladiščenju v njem, imenujemo sekundarna mikroflora. Velikost in sestava sekundarne mikroflore sta odvisna od hitrosti in temperature hlajenja mleka po molži, dolžine skladiščenja, higiene opreme za hlajenje in števila ter vrste primarne mikroflore mleka.

Pomembna dejavnika, ki preprečujeta hitro razmnoževanje primarne mikroflore, sta hitrost in končna temperatura hlajenja. Optimalno je, da mleko takoj po molži, v času dveh ur, ohladimo do temperature $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, in ga pri tej temperaturi skladiščimo.

Kljub vzdrževanju najvišje stopnje higienskih razmer ni mogoče proizvesti mleka brez mikroorganizmov. Mleko je namreč primerno gojišče za razvoj številnih mikroorganizmov.

Mikroorganizmi prispejo v vime skozi odprtine v seskih, razmnožujejo se v mlečni žlezi in med molžo postanejo normalna mikroflora mleka. Sveže pomolzeno mleko zdravih krav ima lahko nekaj sto ali več tisoč mikroorganizmov v 1 ml mleka.

1.2.1 Vrste mikroorganizmov v mleku

V mleku so poleg bakterij prisotne tudi kvasovke in plesni:

Glede na njihovo delovanje jih razdelimo na:

- *tehnološko koristne mikroorganizme*, ki jih kot starter kulture uporabljamo za izdelovanje fermentiranih mlečnih izdelkov (mlečnokislinske bakterije, propionske bakterije, žlahtne plesni itd.),
- *tehnološko škodljive mikroorganizme*, ki povzročajo kvarjenje, oziroma napake mleka (proteolitični in lipolitični mikroorganizmi itd.),
- *zdravju škodljive ali patogene mikroorganizme*, ki ogrožajo zdravje potrošnika (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* idr.).

1.2.2 Skupine mikroorganizmov, ki so prisotne v surovem mleku

Mikroorganizmi živijo in so aktivni v različnih temperaturnih območjih, zato jih razvrstimo v naslednje skupine:

- *psihrotrofni* - minimalna temperatura od 0 do 5 °C, optimalna temperatura od 20 do 35 °C, maksimalna temperatura od 25 do 40 °C.
- *psihrofilni* - minimalna temperatura 0 °C, optimalna temperatura od 5 do 20 °C.
- *mezofilni* - minimalna temperatura od 5 do 20 °C, optimalna temperatura od 30 do 45 °C, maksimalna temperatura od 40 do 50 °C.
- *termofilni* - minimalna temperatura od 35 do 45 °C, optimalna temperatura od 45 do 70 °C, maksimalna temperatura od 60 do 80 °C.

1.3 Skupno število mikroorganizmov (SSMO)

Skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v surovem mleku, med katerimi vedno prevladujejo bakterije, se lahko giblje od manj kot 1000 v ml ob minimalni okužbi med molžo, do več kot 10^6 v ml ob močni okužbi. Pri metodi štetja kolonij mikroorganizmov, poraslih na trdnem gojišču, izražamo rezultat kot število kolonijskih enot v ml mleka.

1.4 Ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij

Poznamo več načinov za določanje števila mikrobnih celic. Pri nekaterih metodah merimo število živih celic, pri drugih pa težo celotne populacije, ki je neposredno sorazmerna s številom celic. Število celic običajno izražamo kot število celic v 1 ml tekočega vzorca ali v 1 g živila. Večina metod štetja temelji na neposrednem ali posrednem štetju majhnih vzorcev. Velikost celotne bakterijske populacije se nato izračuna.

1.4.1 Indirektne ali gojitvene metode

a) Štetje na trdnih gojiščih je najpogostejše uporabljena metoda štetja celic. Ta metoda se uporablja predvsem za ugotavljanje števila mikroorganizmov v tekočinah (voda, mleko, itd.) in v materialih, ki jih je mogoče suspendirati v tekočini. Pri tej metodi štejemo žive celice. V preiskovanem materialu je navadno preveč bakterij, da bi jih lahko šteli in je zato treba material ali kulturo najprej redčiti ter primerne razredčine cepiti na plošče hranilnega agarja. Gojitveni pogoji (temperatura, čas inkubacije ter uporabljena gojišča) so odvisni od bakterij, na katere se material preiskuje. Po 24 – 48-urni inkubaciji pri določeni temperaturi (najpogostejše pri 30 °C ali 37 °C) kolonije preštujemo. Običajno štejemo na ploščah, ki imajo od 25 do 300 kolonij.

Število kolonij, ki zrastejo na plošči hranilnega agarja, ni zmeraj enako številu bakterij v kulturi. Zato pravimo, da na plošči preštujemo enote, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU).

Primer ugotavljanja števila bakterij s štetjem na ploščah:

Iz vsake od treh epruvet z razredčinami 10^{-7} , 10^{-8} in 10^{-9} smo cepili po 1 ml na vsako od treh plošč. Po inkubaciji smo prešteli naslednje število kolonij:

Končna redčenja na ploščah	Število kolonij
10^{-7}	201, 187, 223
10^{-8}	17, 25, 19
10^{-9}	3, 2, 1
	$\Sigma = 678$

Izračun povprečnega števila kolonij:

1. način:

Potrebno je izračunati povprečje za vsako razredčino posebej in nato še povprečje vseh razredčin.

$$\text{Za razredčino } 10^{-7}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{611}{3} = 203,66 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\text{Za razredčino } 10^{-8}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{61}{3} = 20,33 \cdot 10^8 = 203,33 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\text{Za razredčino } 10^{-9}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{6}{3} = 2 \cdot 10^9 = 200 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\frac{\sum \text{vseh pop. posamezne razred.}}{\text{št. razred.}} = \frac{203,66 \cdot 10^7 + 203,33 \cdot 10^7 + 200 \cdot 10^7}{3} =$$

$$\frac{\sum \text{vseh pop. posamezne razred.}}{\text{št. razred.}} = 202,33 \cdot 10^7 / \text{ml} = 202 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

2. način:

Če predpostavimo, da so vsa redčenja enakovredna, lahko dodamo številu prešteti kolonij drugega redčenja eno ničlo, številu kolonij tretjega pa dve ničli. Dobljeno vsoto vseh kolonij delimo s številom meritev in dobimo povprečno število kolonij.

Za razredčino 10^{-7} : 201, 187, 223

Za razredčino 10^{-8} : 170, 250, 190

Za razredčino 10^{-9} : 300, 200, 100

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{\sum \text{vseh paralelk}} = \frac{(201 + 187 + 223) \cdot 10^7 + (170 + 250 + 190) \cdot 10^7 + (300 + 200 + 100) \cdot 10^7}{9} =$$

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{\sum \text{vseh paralelk}} = 202,33 \cdot 10^7 / \text{ml} = 202 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

3. način:

Če predpostavimo, da vsa redčenja niso enakovredna, saj se napaka z vsakim višjim redčenjem veča, pa lahko število CFU ugotavljamo tudi tako, da najbolj razredčenemu vzorcu pripišemo največjo težo. Sešteti je potrebno vse kolonije, ki smo jih prešteli na ploščah agarja in vsoto deliti s številom, ki je odvisno od števila razredčitev in števila paralelek npr. tri različne razredčine s po dvema paralelkama; N=222 oz. za naš primer; tri redčenja, vsako s tremi paralelkami N=333.

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{N} = \frac{678}{333} \cdot 10^9 = 203,6 \cdot 10^7 / \text{ml} = 203 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

b) Metoda najverjetnejšega števila (Most probable number (MPN))

Metoda temelji na opazovanju rasti mikroorganizmov (kot motnosti) in opazovanju metabolne dejavnosti mikroorganizmov (preko indikatorjev v tekočih gojiščih). To je metoda, pri kateri kulturo ali preiskovani vzorec cepimo v serijo tekočih gojišč in glede na število gojišč, v katerih ugotovimo bakterijsko rast z verjetnostnim računom, ugotavljamo približek za število bakterij v vzorcu. Ta metoda se rutinsko uporablja pri ugotavljanju števila koliformnih bakterij v vodi.

1.4.2 Direktne ali števne metode

Pri teh metodah štejemo bakterijske celice v vzorcu, kar lahko delamo na mikroskopskih preparatih ali s posebnimi napravami (npr. Coulterjev števec delcev). Za takšno štetje uporabljamo objektne ploščice s števni komorami. Na označen kvadrat razmažemo vzorec in ga pokrijemo s krovnim stekelcem. S pomočjo mikroskopa preštejemo število bakterij v kvadratih in izračunamo poprečno število mikroorganizmov v vzorcu.

1.4.3 Fizikalne in kemijske metode

- *Turbidimetrija* – merjenje motnosti suspenzije – optična gostota (optical density, OD) s spektrofotometrom. Določena optična gostota ustreza določeni gostoti celic in zato se lahko optična gostota odčita z umeritvene krivulje kot število bakterij na ml.

- Ugotavljanje suhe ali mokre teže bakterij.
- Ugotavljanje skupnega dušika.
- Membranska filtracija – se uporablja za štetje bakterij v bistrih tekočih vzorcih (vodovodna voda, bistri sokovi, vino itd.) ter za štetje koliformnih bakterij, ki so kazalci fekalnih okužb živil in vode.

1.5 Gojišča

• Gojišče PCA

Gojišče PCA se uporablja za določevanje skupnega števila mikroorganizmov in psihrotrofnih mikroorganizmov.

Sestava:

glukoza	1,0 g
kvasni ekstrakt	2,5 g
agar	14,0 g
pepton iz kazeina	5,0 g
destilirana voda	1000 ml
mleko v prahu	1,0 g

Zatehtati je potrebno vse zahtevane komponente razen mleka v prahu in jih raztopiti v 980 ml destilirane vode. Zmes je nato potrebno zmešati na magnetnem mešalu in segrevati, dokler se ne raztopi. Gojišče ne sme zavreti ali se predolgo segrevati. Ko se komponente za PCA gojišče raztopijo, je potrebno gojišče nekoliko ohladiti in nato primešati raztopino mleka v prahu. Zahtevana količina mleka v prahu se raztopi v 20 ml destilirane vode.

pH gojišča se uravna na $7,0 \pm 0,2$. Še tekoče gojišče se prelije v epruvete in sterilizira v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

• Gojišče VRBL

Gojišče se uporablja za ugotavljanje števila koliformnih mikroorganizmov v vzorcih mleka.

Sestava:

kvasni ekstrakt	3,0 g
natrijev klorid	5,0 g
pepton iz kazeina	7,0 g

laktoza	10,0 g
agar	12-18 g
nevtral rdeče	0,03 g
kristalno vijolično	0,002 g
žolčne soli	1,5 g
destilirana voda	1000 ml

Vse komponente je potrebno zatehtati in doliti 1000 ml destilirane vode. Ob intenzivnem mešanju segrevamo tako dolgo, da se komponente raztopijo in dobimo bistro tekočino. Ko se gojišče ohladi, je potrebno uravnati vrednost pH na $7,4 \pm 0,2$. Še tekoče gojišče se prelije v epruvete in sterilizira v avtoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minut.

• Gojišče YGC

Gojišče YGC se uporablja za ugotavljanje števila kvasovk in plesni.

Sestava:

glukoza	20,0 g
kloramfenikol	0,1 g
kvasni ekstrakt	5,0 g
agar	14,9 g
destilirana voda	1000 ml

Vse komponente je potrebno zatehtati in doliti 1000 ml destilirane vode. Ob intenzivnem mešanju segrevamo tako dolgo, da se komponente raztopijo in dobimo bistro tekočino. pH gojišča se uravna na $6,6 \pm 0,2$. Še tekoče gojišče se prelije v epruvete in sterilizira v avtoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minut.

VAJA 1: Ugotavljanje števila bakterij v svežem, pasteriziranem in UHT mleku

Material:

- sveže nepasterizirano mleko
- UHT mleko
- 30 plošč hranilnega agarja
- sterilne epruvete
- epruvete z 9 ml fiziološke raztopine
- pipete
- vodna kopel (63 °C)

Potek vaje:

- V epruveto odpipetirajte 2 – 3 ml svežega mleka. Preostalo mleko postavite v vodno kopel (63 °C) in ga inkubirajte 35 minut.
- Pripravite 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6} razredčine svežega mleka.
- Na prvih 8 plošč hranilnega agarja napišite temperaturo 37 °C in razredčine 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6} . Za vsako razredčino pripravite po dve paralelki.
- Na naslednjih 8 plošč napišite enake razredčine in temperaturo 55 °C. Za vsako razredčino pripravite po dve paralelki.
- Na vsako ploščo cepite po 100 μ l primerne razredčine mleka.
- Gojišča inkubirajte pri 37 °C ali pri 55 °C.
- Pripravite še 10^{-1} , 10^{-2} in 10^{-3} razredčine pasteriziranega in UHT mleka in cepite po 100 μ l ustrezne razredčine na plošče, na katere ste predhodno napisali določeno temperaturo in razredčino. Za vsako razredčino pripravite po dve paralelki. Prav tako jih inkubirajte pri določeni temperaturi (pri 37 °C ali pri 55 °C).

Rezultati in diskusija

- Opišite namen vaje.
- Po končani inkubaciji preštajte kolonije, ki so zrasle na ploščah, in primerjajte število bakterij, ki zrastejo pri eni ali drugi temperaturi ter število bakterij v surovem in UHT mleku. Rezultate prikažite tabelarično.
- Kakšna je razlika med pasteriziranim in nepasteriziranim mlekom?
- Zakaj inkubiramo plošče pri dveh različnih temperaturah?
- Izračunajte velikost bakterijske populacije na ml posameznega mleka na vse tri načine.

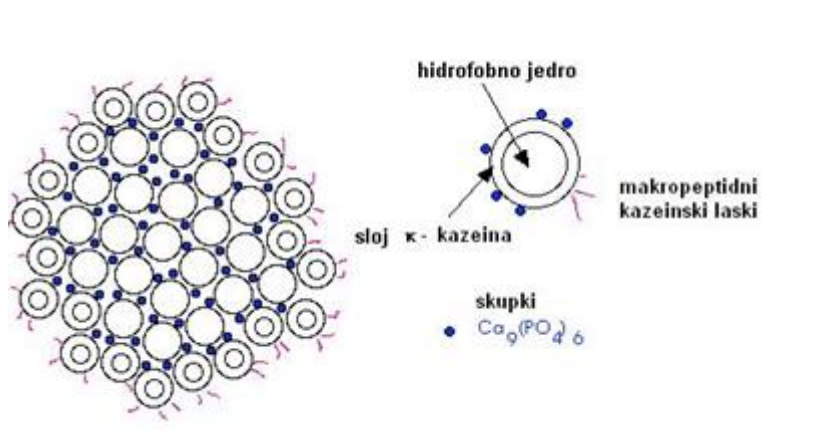
2. KAZEIN

Kazein je glavni protein v mleku in predstavlja 80 % delež vseh prisotnih proteinov v mleku. Njegova molska masa je okrog 34 kDa. Uvršča se v skupino fosfoproteinov, kamor spada tudi vitelin iz jajčnega rumenjaka.

Poznamo štiri oblike kazeina: α_{s1} -, α_{s2} -, β - in κ -kazein. Skupaj predstavljajo heterogeno zmes proteinskih komponent – kazein, čeprav ima vsak od njih drugačno sestavo. V mleku je kazein prisoten v obliki kalcijeve soli. Fosforna kislina je vezana za OH-skupino serina. Kazein koagulira v kislem okolju ali ob dodatku sirila (mešanica encimov), ne pa pri povišanju temperature. Kot mnogi drugi proteini živalskega izvora (miozin, albumin) tudi kazein vsebuje vse esencialne aminokisline, potrebne za normalni razvoj in rast človeka.

V molekuli kazeina je le malo sekundarnih ali terciarnih struktur, saj vsebuje veliko prolinskih ostankov, ki se ne povezujejo v višje strukture, in nič disulfidnih vezi. To je razlog, da kazein pri segrevanju ne denaturira. Je relativno hidrofoben in le slabo topen v vodi.

Kazein se nahaja v mleku v obliki miceli (Slika 1), agregatov z nekaj tisoč med seboj združenimi molekulami kazeina s premerom od 10 do 300 nm, ki dajejo mleku njegovo značilno belo barvo. Kazeinske molekule združujejo v micelle kalcijevi ioni in hidrofozne povezave.



Slika 1: Micelna struktura kazeina.

Struktura kazeina je zelo kompleksna in do danes še ni popolnoma raziskana. Izoelektrična točka kazeina znaša 4,6. Prečiščena beljakovina je v vodi ter v nevtralnih solnih raztopinah netopna, topi se pa v alkalnih raztopinah (na primer v raztopini natrijevega oksalata ali natrijevega acetata).

Kazein se uporablja v prehrabeni industriji (otročka prehrana, kot dodatek k omakam in instant juham, sladoledu, pri pridelavi sirov), v industriji lepil, v kozmetični industriji, v industriji pigmentov in barvil, v papirni industriji, v lesni industriji, za izdelavo zaščitnih oblog in umetnih mas itd.

Bodybuilderji uporabljajo pripravke iz kazeina kot prehransko dopolnilo – kazein predstavlja počasi prebavljiv vir aminokislin.

VAJA 2: Izolacija proteinov iz biološkega materiala – izolacija kazeina iz mleka

Material:

50 ml mleka

0,05 M HCl

Potek vaje:

50 mL neprekuhanega precejenega mleka razredčimo s 150 ml destilirane vode. Razredčeno mleko segrejemo na 40 °C. Nato ob intenzivnem mešanju postopoma dodajamo 0,05 M HCl do pH 4,6 (izoelektrična točka). Za to je potrebno okoli 50 ml kisline. Spremembo pH zasledujte s pH metrom. Nadaljujte z mešanjem še 5 do 10 min, nato čašo postavite za 30 min v hladilnik, da se oborina posede.

Supernatant ločite od usedline (oddekantirajte). Supernatant shranite ter nato določite vsebnost proteinov po Bradfordu. Usedlino s preostankom supernatanta prelijte v štiri 50 mL centrifugirke (falkonke) ter centrifugirajte pri 4000 obrat/min 10 min. Preostali supernatant prelijte k predhodnemu, ki ste ga shranili za določitev vsebnosti proteinov po Bradfordu. Usedlino resuspendirajte v destilirani vodi. V vsako falkonko dodajte 45 ml destilirane vode, intenzivno premešajte, da se usedlina resuspendira v destilirani vodi. Pomagate si lahko z vorteksom. Postopek ponovite 3 krat.

Dobljeni kazein nato sušimo v vakuum eksikatorju. Kot sušilno sredstvo uporabimo kalcijev klorid (CaCl₂).

Supernatantu in dobljenemu kazeinu določite vsebnost proteinov po Bradfordu.

Bradfordova metoda za določevanje totalnih proteinov

a) Priprava Bradford-ovega reagenta:

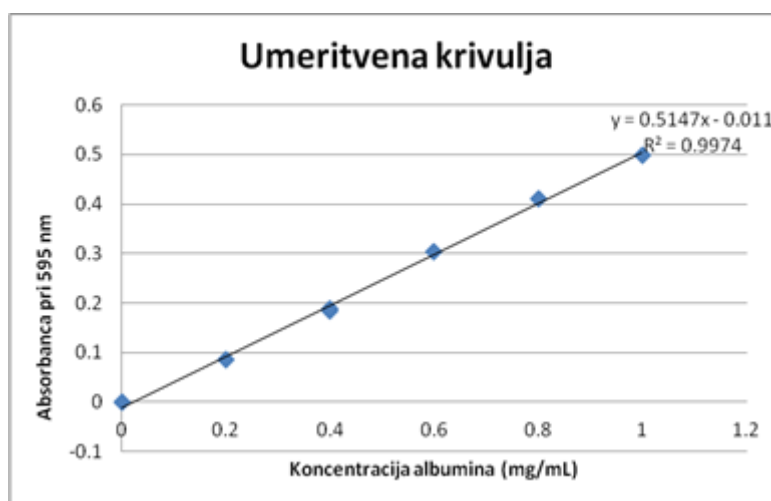
Bradford-ov reagent smo pripravili tako, da smo raztopili 100 mg Coomassie Brilliant Blue v 50 ml 95 % etanola in v 100 ml 85 % (v/v) fosforne kisline (H_3PO_4) ter razredčili z Milli-Q vodo do oznake 1 l.

b) Priprava umeritvene krivulje:

Za pripravo umeritvene krivulje (Slika 2) smo uporabili protein albumin v koncentracijskem območju od 0 do 1 mg/ml. Pripravimo si koncentracije albumina. Zatehtamo 10 mg albumina in dodamo 1 ml Milli-Q vode.

10 mg/ml → razredčimo po naslednjem principu:

samo Milli-Q voda (Blank)	→	0,0 mg/ml
20 µl albumina (10 mg/ml) + 980 µl Milli-Q vode	→	0,2 mg/ml
40 µl albumina (10 mg/ml) + 960 µl Milli-Q vode	→	0,4 mg/ml
60 µl albumina (10 mg/ml) + 940 µl Milli-Q vode	→	0,6 mg/ml
80 µl albumina (10 mg/ml) + 920 µl Milli-Q vode	→	0,8 mg/ml
100 µl albumina (10 mg/ml) + 900 µl Milli-Q vode	→	1,0 mg/ml



Slika 2: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije albumina.

c) Priprava vzorcev za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu

V mikrocentrifugirke odpipetiramo 1 ml Bradfordovega reagenta, nato dodamo 20 µl vzorca. Mikrocentrifugirke zvorteksiramo ter inkubiramo 15 minut na sobni temperaturi. Nato izmerimo absorbanco pri 595 nm. Za slepi vzorec namesto 20 µl vzorca vzamemo 20 µl ali milliQ vode ali odgovarjajočega pufra.

Primer:

Slepi vzorec:

1 ml Bradfordovega reagenta
20 µl milliQ vode
vorteks, 15 min inkubiranja na sobni T
merjenje absorbance pri 595 nm

Vzorec:

1 ml Bradfordovega reagenta
20 µl željenega vzorca
vorteks, 15 min inkubiranja na sobni T
merjenje absorbance pri 595 nm

Po preračunavanju iz umeritvene krivulje dobimo koncentracijo proteinov v vzorcu.

Rezultati in diskusija

- Supernatantu in dobljenemu kazeinu določite vsebnost proteinov po Bradfordu.

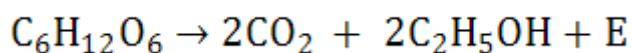
3. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Fermentacija je poznana že vsaj 9000 let, vendar jo kljub navidezni preprostosti nenehno izpopolnjujejo. Prvi, ki so dokazano izdelovali alkoholne pijače, so bili stari Babilonci, ki so fermentacijo poznali že okoli leta 7000 pred Kristusom. Znali so izdelovati pivo, ki se je nato razširilo v Egipt, kjer je poleg kruha in čebule sestavljal vsakodnevni jedilnik povprečnega kmeta. Louis Pasteur je v 19. stoletju dokazal, da fermentacijo izvajajo živi organizmi, glive kvasovke.

Kvasovke so enocelični evkariontski fakultativno anaerobni organizmi. Kvasovke ob prisotnosti kisika presnavljajo sladkor (glukozo) z aerobnim celičnim dihanjem. Kadar kisika zmanjka oz. ni prisoten, sladkor presnavljajo anaerobno z alkoholnim vrenjem. V primeru prisotnosti kisika se reakcije nadaljujejo z ocetnokislinskim vrenjem, pri katerem iz etanola nastaneta etanojska kislina in voda.

Alkoholno vrenje je proces, pri katerem kvasne celice pretvarjajo glukozo v alkohol in ogljikov dioksid. Med reakcijo naraste temperatura, torej je reakcija eksotermna. Glive kvasovke ne morejo razgraditi vsega sladkorja v raztopini. Ko koncentracija alkohola doseže neko kritično mejo, npr. 9-15 % oziroma pri nekaterih tudi do 18 %, se vrenje ustavi, saj kvasovke odmrejo, ker niso rezistentne na tako visoke koncentracije etanola.

Pri vrenju se spreminjajo sladkorji v alkohol in ogljikov dioksid po Gay-Lussacovi enačbi:



glukoza ogljikov dioksid etanol energija

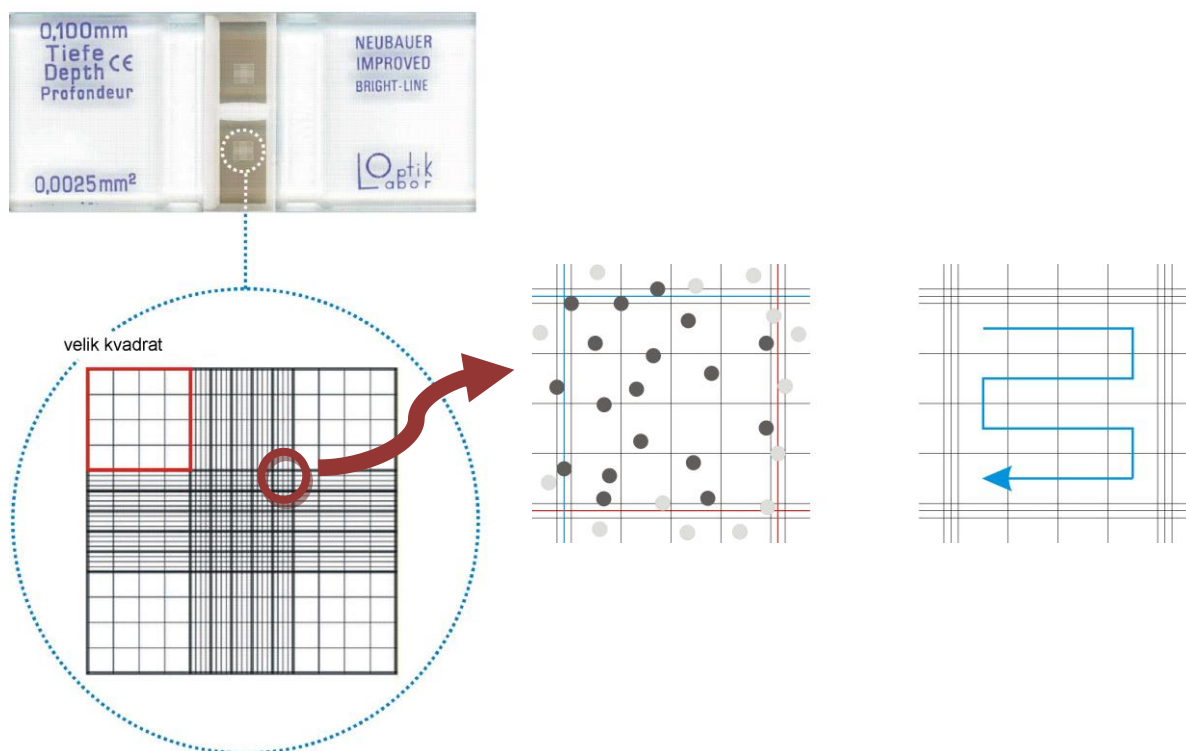
Molekula glukoze se razcepi na dve molekuli piruvata, energija te eksotermne reakcije pa se porabi za vezavo anorganskih fosfatov na adenzin difosfat (ADP) ter redukcijo nikotinamid dinukleotida (NAD^+ v NADH). Molekuli piruvata se nato pretvorita v dve molekuli etanala oz. acetaldehida in pri tem oddata po eno molekulo ogljikovega dioksida. Acetaldehida sta nato pretvorjena v etanol z oksidacijo NADH , tj. vezavo vodikovega protona.

3.1 Metode za določevanje števila mikrobnih celic in koncentracije suhe mase

3.1.1 Direktna ali števna metoda

Pri teh metodah štejemo bakterijske celice v vzorcu, kar lahko delamo na mikroskopskih preparatih ali s posebnimi napravami (npr. Coulterjev števec delcev). Za takšno štetje uporabljamo objektne ploščice s števnimi komorami. Na označen kvadrat razmažemo vzorec in ga pokrijemo s krovnim stekelcem. S pomočjo mikroskopa preštujemo število bakterij v kvadratih in izračunamo poprečno število mikroorganizmov v vzorcu.

Primer: Štetje v komori po Neubauer-ju (hemocitometer, Slika 3), je natančnejša metoda, pri kateri se uporablja posebno objektno stekelce z vrisano mrežo. To omogoča štetje mikroorganizmov (kvasovke, spore gliv) v točno določenem volumnu.



Slika 3: Neubauer-jeva komora. Štetje celic kvasovk, desna slika; v števnem področju so celice obarvane temno sivo, medtem ko celice, ki so obarvane svetlo sivo, ne upoštevamo pri končnem številu celic v kvadratu.

Števena komora je posebej oblikovano objektno steklo, ki ima na poglobljenem delu vgravirano mrežo kvadratov. Globina špranje med dnom komore in krovnim stekelcem je 0,1 mm. Mreža števne komore je razdeljena na kvadrate.

Površina večjega kvadrata je $1/25 \text{ mm}^2$, površina manjših kvadratov pa je $1/400 \text{ mm}^2$.

Število celic v mililitru vzorca se izračuna s pomočjo naslednje zveze (Enačba 1)

$$N = X \cdot 25 \cdot 10^4 \quad (1)$$

kjer je X povprečno število celic na en kvadrat, 25 je število kvadratov na mm^2 , 10^4 je faktor za preračunavanje na 1 ml vzorca.

3.1.2 Določanje koncentracije suhe biomase

Odvzeli smo 5 ml vzorca iz vsake erlenmajerice in ga prefiltrirali skozi filtrni papir ($0,22 \mu\text{m}$). Filtrni papir z vzorcem smo shranili v petrijevko in izmerili suho maso. Suho maso smo določili tako, da smo v pečico postavili filtrni papir z vzorcem in sušili do konstantne mase. Koncentracijo suhe biomase (X) smo izračunali po Enačbi 2:

$$(X) = \frac{A-b}{V_{\text{vzorca}}} \quad (2)$$

A...masa filter papirja z vzorcem (g)

b...masa filter papirja (g)

V...volumen odvzetega vzorca (0,005 l)

VAJA 3: Alkoholna fermentacija ob prisotnosti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*

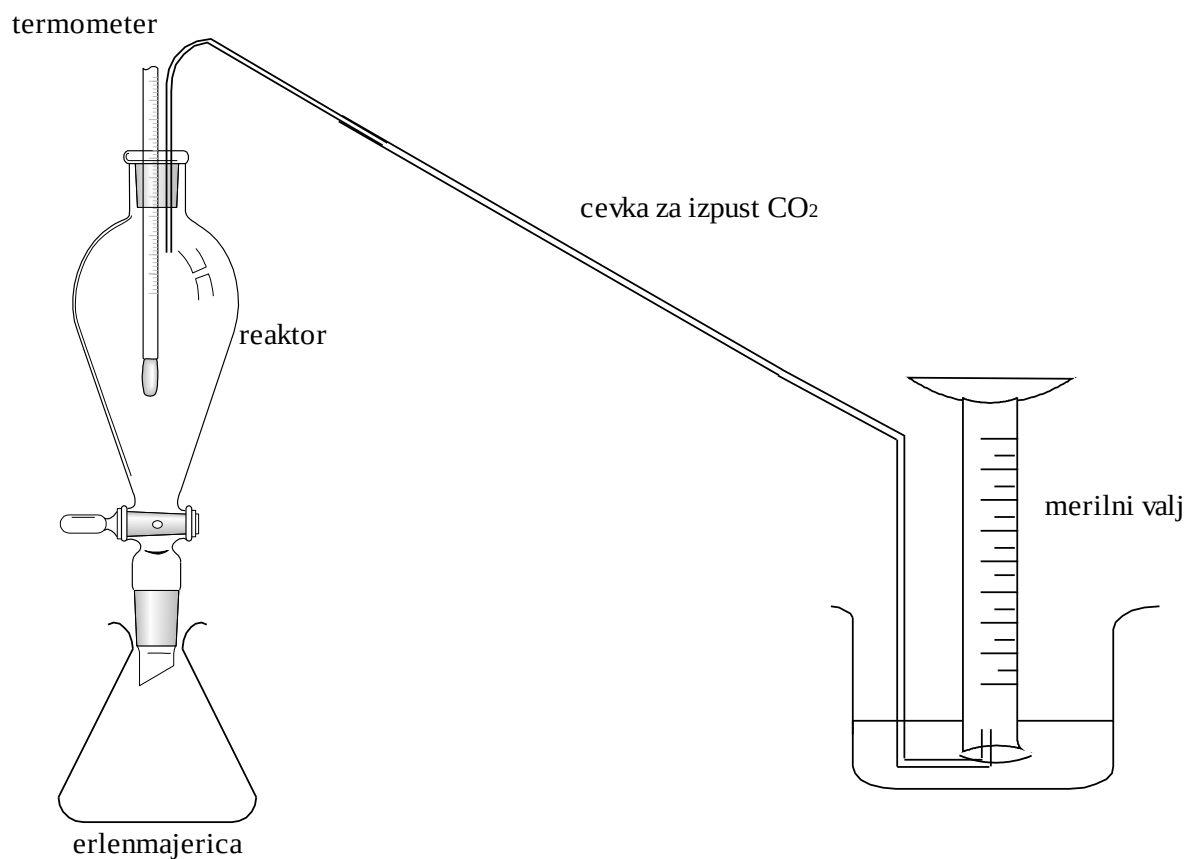
Material:

5 ml kulture kvasovk

300 ml sterilnega gojišča za *Saccharomyces cerevisiae*

Potek vaje:

1. V 300 ml sterilnega gojišča dodamo 5 ml kulture kvasovk.
2. Vsebino zlijemo v bioreaktor (Slika 4).
3. Lij ločnik zapremo z zamaškom, ki ima dve odprtini: eno za termometer in eno za plastično cevko, ki je napeljana v merilni valj.
4. Pripravimo plastično kadičko, v katero nalijemo vodo.
5. Izmerimo temperaturo. Pripravimo in označimo čaše.
6. Na merilnem valju označimo raven vode.
7. Na začetku poizkusa v čašo izlijemo 20 ml kvasne suspenzije. Po 20 minutah v sterilno čašo ponovno izlijemo 20 ml kvasne suspenzije, nato postopek ponavljamo vsakih 20 minut.
8. V tabelo zapisujemo meritve volumna vode v merilnem valju in temperaturo na začetku, po 20 min, 40 min, 60 min, 80 min itd. Vsakih 5 minut premešamo bioreaktor.
9. S pomočjo Neubauer-jeve komore določimo število kvasovk v 1 ml suspenzije.
10. Odpipetiramo 5 ml kvasne suspenzije iz odvzetega vzorca ter določimo koncentracijo suhe biomase (uporabi filtrni papir za ločitev biomase od tekočine ter suši do konstantne mase).
11. Vzorec prefiltriramo in z refraktometrom izmerimo koncentracijo glukoze v kvasni suspenziji na začetku, po 20 min, 40 min, 60 min, 80 min.



Slika 4: Aparatura za spremljanje alkoholnega vretja.

Rezultati in diskusija

- Meritve podajte v obliki tabele:

Čas (min)	Temperatura (°C)	Št. kvasovk (št. kvasovk/ml)	V CO ₂ (ml)	Koncentracija glukoze (%)	Koncentracija suhe biomase (g/ml)
0					
20					
40					
60					
80					

- Narišite še pripadajoče diagrame v odvisnosti od časa ter utemeljite dobljene rezultate.

4. LITERATURA

- Bajt, N., Golc-Teger, S. *Izdelava jogurta, skute in sira*. Ljubljana ČZP Kmečki glas, 2002.
- Bole-Hribovšek, V., Hostnik, P. *Osnove dela v mikrobiološkem laboratoriju, Priročnik za vaje iz mikrobiologije za veterinarje*. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1996.
- Brzin, B., Budič, S., Gubina, M., Kozak, M., Likar, M., Stropnik, Z., Vozelj, M., Zajc-Satler, J. *Praktikum iz mikrobiologije in parazitologije*. Likar, M. (ur.). Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo medicinske fakultete v Ljubljani, Ljubljana : Univerza v Ljubljani, 1972.
- Hayes, P.R. *Food Microbiology and Hygiene*. London, New York, Elsevier, 1985.
- Janc, M., Rupnik, M. *Splošna mikrobiologija : navodila za vaje*, (Knjižna zbirka Scripta, Mikrobiologija). Ljubljana: ŠOU, Študentska založba, 1998.
- Kapun-Dolinar, A. *Mikrobiologija*. Kurnik, U., Lorenčič, A. (ur.). 1. natis, Zavod RS za šolstvo, Ljubljana, 2001.
- Likar, M. *Mikrobiologija*. 2. izdaja, Dopisna delavska univerza Univerzum Ljubljana, 1979.
- Mavrin, D., Oštir, Š. *Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije, 2002.
- Petrič, N. *Živilska mikrobiologija z biotehnologijo. [Elektronski vir] : laboratorijske vaje*. Ljubljana :Biotehniški izobraževalni center, 2010. ISBN 978-961-92973-5-3.
- Rogelj, I. *Mleko: V: Mikrobiologija mleka in mlečnih izdelkov*. Bem, Z., Adamič, J., Žlender, B., Smole Možina, S., Gašperlin, L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2003.
- Süssmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag : Stuttgart· New York, 1999.
- Tratnik, L. *Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga, 1998.